

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 06-293645

(43)Date of publication of application : 21.10.1994

(51)Int.Cl.

A61K 31/70
// C07H 19/10
C07H 19/20
C12N 9/99

(21)Application number : 05-083391

(71)Applicant : SANEYOSHI MINERO
SHUDO KOICHI

(22)Date of filing : 09.04.1993

(72)Inventor : SANEYOSHI MINERO
SHUDO KOICHI**(54) REVERSE TRANSCRIPTASE INHIBITOR****(57)Abstract:**

PURPOSE: To obtain a reverse transcriptase inhibitor having a strong inhibitory effect on a reverse transcriptase produced by HIV and useful for improvement and prevention of AIDS and for suppression or retardation of the crisis after infection with AIDS virus.

CONSTITUTION: There is provided a reverse transcriptase inhibitor containing 2'-deoxy-L-ribonucleotide-5'-triphosphate, preferably 2'-deoxy-L-thymidine-5'-triphosphate as the active component and having a strong inhibitory effect on a reverse transcriptase produced by retrovirus. This compound can be produced by converting an L-nucleotide (an optical antipode of a natural type nucleotide) into its monophosphate, e.g. in the presence of phosphorus oxychloride and subsequently synthesizing its corresponding 5'-triphosphate compound therefrom, e.g. according to phosphorimidazolidate method. This compound is also useful as a reagent for studies in the fields of biochemistry, genetic engineering etc.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination] 07.04.2000

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the
examiner's decision of rejection or application
converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number] 3693357

[Date of registration] 01.07.2005

[Number of appeal against examiner's decision of
rejection][Date of requesting appeal against examiner's decision
of rejection]

[Date of extinction of right]

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平6-293645

(43)公開日 平成6年(1994)10月21日

(51)Int.Cl. ⁵	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
A 6 1 K 31/70	ADY	8314-4C		
// C 0 7 H 19/10				
19/20				
C 1 2 N 9/99				

審査請求 未請求 請求項の数 2 O L (全 5 頁)

(21)出願番号	特願平5-83391	(71)出願人	593070147 実吉 峯郎 東京都八王子市散田町 1-7-7-305
(22)出願日	平成5年(1993)4月9日	(71)出願人	000182432 首藤 紘一 東京都目黒区東山 2丁目25番 6-102号 公務員宿舎
		(72)発明者	実吉 峯郎 東京都八王子市散田町 1-7-7-305
		(72)発明者	首藤 紘一 東京都目黒区東山 2丁目25番 6-102号公 務員宿舎
		(74)代理人	弁理士 今村 正純

(54)【発明の名称】 逆転写酵素阻害剤

(57)【要約】

〔構成〕 2'-デオキシ-リボヌクレオシド
5'-トリリン酸、例えば2'-デオキシ-リチミジ
ン 5'-トリリン酸を有効成分として含む逆転写酵素
阻害剤。

〔効果〕 レトロウイルス、例えばHIVの産生する逆
転写酵素を強く阻害するので、エイズの治療や予防、な
らびにエイズ・ウイルス感染後の発病抑制・遅延に有用
である。また、生化学、遺伝子工学等の研究のために用
いられる試薬としても有用である。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 2'-デオキシ-リボヌクレオシド
5'-トリリル酸を有効成分として含む逆転写酵素阻
害剤。

【請求項2】 2'-デオキシ-リチミジン 5'-
トリリル酸を有効成分として含む請求項1記載の逆転写
酵素阻害剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、逆転写酵素阻害剤に関
する。さらに詳しくは、本発明は、エイズウイルス（H
IV：ヒト免疫不全ウイルス）等のレトロウイルスが産
生する逆転写酵素を阻害し、後天性免疫不全症候群（AI
DS、エイズ）の治療や感染後の発病抑制に有用な逆転写
酵素阻害剤に関する。

【従来の技術】従来、天然型ヌクレオシドの光学対掌体
（エナンチオマー）である非天然型エナンチオヌクレオ
シドが種々合成されてきた。これらのうち、L型ヌクレ
オシドに属する3'-チア-2'-デオキシ-リ-シチ
ジン(3TC, Antimicrob. Agents Chemother., 36, 1688-1
694, 1992) および3'-チア-2'-デオキシ-5-
フルオロ-リ-シチジン(FTC, Antimicrob. Agents Che
mother., 36, 2423-2431, 1992) には強い抗HIV活性
が報告されている。また、リチミジンが、単純ヘルペ
スウイルスI型にコードされるチミジンキナーゼによっ
てリン酸化され、感染細胞中におけるウイルスの複製を
阻害することが報告されている(J. Med. Chem., 35, 42
14-4220, 1992)。

【0002】

【発明が解決しようとする課題および課題を解決するた
めの手段】本発明者は、2'-デオキシ-リボヌク
レオシド 5'-トリリル酸を製造してその生物活性を
検討したところ、この化合物がレトロウイルスの産生す
る逆転写酵素を強く阻害することを見出し、本発明を完
成するに至った。本発明の逆転写酵素阻害剤は、特にH
IVの産生する逆転写酵素を強く阻害するので、エイズ
の治療や予防、ならびにエイズ・ウイルス感染後の発病
抑制・遅延に有用である。また、生化学、遺伝子工学等
の研究のために用いられる試薬としても有用である。本
発明の逆転写酵素阻害剤に有効成分として含まれる2'-
デオキシ-リボヌクレオシド 5'-トリリル酸
としては、例えば、2'-デオキシ-リチミジン
5'-トリリル酸；2'-デオキシ-リウリジン
5'-トリリル酸；2'-デオキシ-リアデノシン
5'-トリリル酸；2'-デオキシ-リグアノシン
5'-トリリル酸；2'-デオキシ-リシチジン
5'-トリリル酸等の天然型2'-デオキシリボヌクレ
オシド 5'-トリリル酸の光学対掌体、および2'-
デオキシ-リ-5-フルオロウリジン 5'-トリリル
酸等の非天然型2'-デオキシリボヌクレオシド 5'-

トリリル酸の光学対掌体を挙げることができる。

【0003】本発明の逆転写酵素阻害剤に有効成分とし
て含まれる2'-デオキシ-リボヌクレオシド
5'-トリリル酸は、リチミジン等のL-ヌクレオシ
ド（天然型ヌクレオシドの光学対掌体）を、例えばオキ
シ塩化りん等により5'-モノリン酸化体とした後、例
えばホスホロイミダゾリデート法によって対応する5'-
トリリル酸化体とすることにより製造することができ
る。本発明の逆転写酵素阻害剤を、例えばHIVウイル
ス等のレトロウイルスの関与する疾患などの治療や予
防、またはレトロウイルス感染後の発病抑制あるいは遅
延のための医薬として用いることができる。この場合に
は、上記の2'-デオキシ-リボヌクレオシド
5'-トリリル酸を有効成分として含む医薬組成物とし
て患者に投与すればよい。医薬組成物としては、例え
ば、カプセル剤、錠剤、細粒剤、顆粒剤、散剤、シロッ
プ剤等の経口投与用組成物、あるいは注射剤、坐剤、点
眼剤、眼軟膏、点耳剤、または外用剤等の非経口投与
用組成物を挙げることができる。これらの医薬用組成物
は常法により製造できるが、必要により薬理学的、製剤
学的に許容しうる添加物を加えて製造してもよい。

【0004】経口剤及び坐剤の製造には、乳糖、D-マン
ニトール、トウモロコシデンプン、結晶セルロース等の
賦形剤；カルボキシメチルセルロース、カルボキシメチ
ルセルロースカルシウム等の崩壊剤；ヒドロキシプロピ
ルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、
ポリビニルピロリドン等の結合剤；ステアリン酸マグネ
シウム、タルク等の滑沢剤；ヒドロキシプロピルメチル
セルロース、白糖、酸化チタン等のコーティング剤；又
はポリエチレングリコール、ハードファット等の基剤を
製剤用成分として使用すればよい。注射剤あるいは点
眼、点耳剤の製造には、注射用蒸留水、生理食塩水、ブ
ロビレングリコール等の水性あるいは用時溶解型剤型を
構成しうる溶解剤ないし溶解補助剤；無機又は有機の酸
あるいは塩基のpH調節剤；食塩、ブドウ糖、グリセリン
等の等張化剤；又は安定化剤等の製剤成分を使用すれば
よい。眼軟膏剤、外用剤の製造には、白色ワセリン、
マクロゴール、グリセリン、綿布等の軟膏剤、クリーム
剤、貼付剤に汎用される適切な製剤成分を使用すればよ
い。本発明の逆転写酵素阻害剤を医薬組成物として用い
る場合には、例えば、成人の患者に対して、有効成分で
ある2'-デオキシ-リボヌクレオシド 5'-トリ
リル酸の一日あたり投与量が0.1～1,000 mg/kg 程度
となるように投与すればよいが、治療や予防の目的や患
者の年齢や症状により適宜増減してもよい。

【0005】

【実施例】以下、本発明の好ましい態様である2'-デ
オキシ-リチミジン 5'-トリリル酸についてさら
に具体的に説明するが、本発明はこの化合物およびこれ
らの実施例に限定されることはない。

例1: 2'-デオキシ-L-チミジン 5'-トリリン酸の製造

L-チミジン 2.0mg (0.083ミリモル) をりん酸トリエチル 1ml に溶解し、-10℃に冷却した後、オキシ塩化りん 50μl を添加した。4℃にて16時間反応させた後、反応液を1M炭酸水素ナトリウム水溶液 2ml に攪拌しながら注いだ。中和後、水を添加して全量を 50ml に希釈した後、クロロホルム 10ml で3回洗浄した。水層をDEAE-セルロース (3cm I.D. × 7cm, Whatman DE-52) に吸着させて水洗した後、トリエチルアンモニウムピカーボネートの直線濃度勾配 (0-0.3M, 500ml × 2) で溶出した。5'-モノりん酸を含むフラクションを集めて濃縮し、2'-デオキシ-L-チミジン 5'-モノりん酸 (L-dTMP) を得た。505 OD₂₆₇, (0.1N HCl) 収率 63%

【0006】 2'-デオキシ-L-チミジン 5'-モノりん酸 475 OD₂₆₇ をジメチルホルムアミドに溶解し、カルボニルジイミダゾール 40.5mg を添加後、室温にて3.5時間攪拌した。メタノール 15.4μl を添加して30分攪拌した後、ピロリン酸トリブチルアミン塩ジメチルホルムアミド溶液 (0.6ミリモル/ml) 1ml を添加し室温で24時間攪拌した。反応液を減圧乾固した後、残渣を水 50ml に溶解して、活性炭 1グラムを添加した。穏やかに10分間攪拌した後、残渣に水 50ml を添加して溶解した。この溶液をDEAE-セルロース (3cm I.D. × 7cm, Whatman DE-52) に吸着させて水洗した後、トリエチルアンモニウムピカーボネートの直線濃度勾配 (0-0.5M, 500ml × 2) で溶出した。5'-トリリン酸を含むフラクションを集めて濃縮し、2'-デオキシ-L-チミジン 5'-トリリン酸 (L-dTTP) を得た。370 OD₂₆₇, (0.1N HCl) 収率 7%

* 8%

UV吸収スペクトル: λ max 267 nm (H₂O)

りん原子含量 : 計算値 ε (p) 267 nm (H₂O) = 3,200

実測値 ε (p) = 2,900

HPLC分析 : 保持時間 6.8分 純度 97%
カラム YMC ODS A-302 逆相樹脂、水-アセトニトリルおよび1Mトリエチルアンモニウムアセテート緩衝液 (pH 7.0) (78:2:20, v/v/v)、流速 1ml/分、50℃。

【0007】 例2: 試験例

上記の2'-デオキシ-L-チミジン 5'-トリリン酸 (L-dTTP) を用いて真核生物およびウイルスのDNAポリメラーゼに対する作用を検討した。ポリメラーゼとしては、コウシ胸腺DNAポリメラーゼα (Pol α)、ラットDNAポリメラーゼβ (Pol β: Date, T., et al., Biochemistry, 27, 2983-2990, 1988)、ウシ肝臓DNAポリメラーゼγ (Pol γ: Izuta, S., et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 179, 776-783, 1991)、およびHIV-1由来のレトロウイルス逆転写酵素 (HIV-1 RT) を用いた。DNAポリメラーゼβとレトロウイルス逆転写酵素は、遺伝子組換えにより大腸菌で生産、精製された酵素である。酵素活性測定は、以下の表1に示す条件を用い、各ポリメラーゼを37℃で20分間インキュベートした後、反応液を冷却してDE 81イオン交換紙に吸着させ、5%Na₂HPO₄で6回、つづいて水で2回洗浄した後、イオン交換紙を乾燥して放射活性を測定することにより行った。

【0008】

【表1】

	HIV-1 RT	Pol α	Pol β	Pol γ
50 mM Tris-HCl	pH8.3	pH7.5	pH8.8	
40 mM KPi				pH7.5
MnCl ₂	0.5 mM		0.5 mM	0.5 mM
MgCl ₂		4 mM		
DTT	1 mM	1 mM	1 mM	1 mM
BSA	100 μg/ml	400 μg/ml	400 μg/ml	400 μg/ml
KCl	50 mM		100 mM	50 mM
ポリ[rA]	20 μg/ml		40 μg/ml	40 μg/ml
オリゴ[dT]	10 μg/ml		40 μg/ml	10 μg/ml
活性化DNA		100 μg/ml		
[³ H]dTTP	50 μM	50 μM	50 μM	50 μM
dATP		100 μM		
dCTP		100 μM		
dGTP		100 μM		
酵素量 (ユニット)	0.1-0.6	0.1-0.6	0.1-0.6	0.1-0.6

【0009】 上記の各DNAポリメラーゼに対する2'-デオキシ-L-チミジン 5'-トリリン酸 (L-d

TTP)の作用を50 μ M dTTP存在下で検討した。対照として、抗HIV剤として周知の3'-アジド-3'-デオキシチミジン(AZT)の5'-トリリン酸化体(AZT-TP: Ono, K., et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 140, 498-507, 1986)および α -dTTP(Yamaguchi, T., et al., Chem. Pharm. Bull., 32, 1441-1450, 1984)を用いた。Pol α の鋳型プライマーとして活性化DNAを用いた場合、L-dTTPによる阻害効果はほとんど認められず、Pol β に対しても、ポリ[rA]-オリゴ[dT]を鋳型プライマーとして用いた場合には、わずかな阻害が認められるにすぎなかった。一方、Pol γ に対しては、L-dTTPによる阻害効果が認められたが、AZT-TPと比較すると、その阻害活性はやや低かった。また、 α -dTTPはPol γ に対して弱い阻害作用を示した。レトロウイルス逆転写酵素の活性測定に頻用されるポリ[rA]-オリゴ[dT]を鋳型プライマーとして用いると、L-dTTPはHIV-1 RTに対して強い阻害作用を示した。結果を図1ないし図4に示す。図4に示されたL-dTTPのHIV-1 RTに対する阻害効果について、ラインウィーバーバーク・プロットで酵素阻害様式を検討したところ、L-dTTPは基質であるdTTP*

*Pと拮抗阻害することが示された。HIV-1 RTに対するL-dTTPの K_i/K_m 値は0.07であり、L-dTTPはHIV-1 RTに対して、基質のdTTPよりも約14倍高い親和性を示した。

【0010】

【発明の効果】本発明の逆転写酵素阻害剤は、特にHIVの産生する逆転写酵素を強く阻害するので、エイズの治療や感染後の発病抑制・遅延に有用である。また、生化学、遺伝子工学等の研究のために用いられる試薬としても有用である。

【図面の簡単な説明】

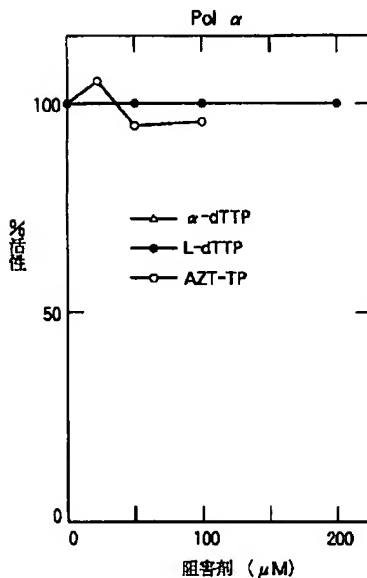
【図1】 コウシ胸腺DNAポリメラーゼ α (Pol α)に対する本発明の逆転写酵素阻害剤の効果を示した図である。

【図2】 ラットDNAポリメラーゼ β に対する本発明の逆転写酵素阻害剤の効果を示した図である。

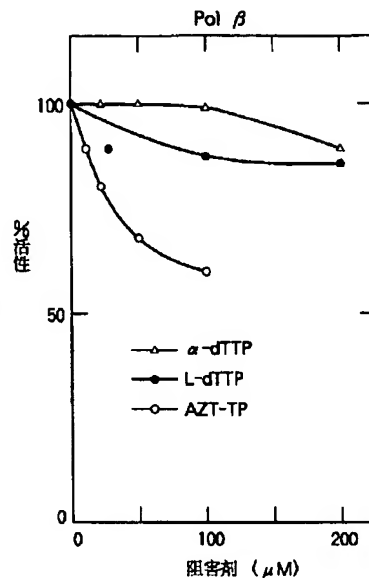
【図3】 ウシ肝臓DNAポリメラーゼ γ に対する本発明の逆転写酵素阻害剤の効果を示した図である。

【図4】 HIV-1由来のレトロウイルス逆転写酵素(HIV-1 RT)に対する本発明の逆転写酵素阻害剤の効果を示した図である。

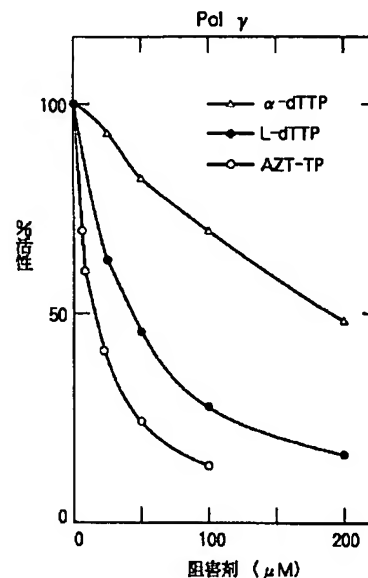
【図1】



【図2】



【図3】



【図4】

